

⑫ 公表特許公報 (A)

平5-509417

⑬ 公表 平成5年(1993)12月22日

⑭ Int. Cl.¹
G 02 B 21/06
G 01 N 21/64識別記号
Z序内整理番号
8106-2K
9115-2J審査請求未請求
予備審査請求有

部門(区分) 6 (2)

(全 5 頁)

⑭ 発明の名称 共焦点走査光学顕微鏡

⑬ 特 願 平3-512239

⑭ ⑬ 出 願 平3(1991)7月16日

⑬ 翻訳文提出日 平5(1993)1月18日

⑬ 国際出願 PCT/GB91/01176

⑬ 国際公開番号 WO92/01966

⑬ 国際公開日 平4(1992)2月6日

優先権主張 ⑭ 1990年7月18日⑬イギリス(GB)⑭9015793.4

⑭ 発明者 エイモス, ウィリアム・ブラッ イギリス, シー・ピー・1 4・ユー・ティー、ケンブリッジ、キ ドシヨー ヤベンディフ・シユ・アベニュ、54

⑭ 出願人 メディカル・リサーチ・カウン イギリス, グブリュ・1・エヌ 4・エイ・エル、ロンドン、バー シル ク・クレツセント、20

⑭ 代理人弁理士 深見 久郎 外3名

⑭ 指定国 A T(広域特許), B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特 許), F R(広域特許), G B(広域特許), G R(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域 特許), S E(広域特許), U S

請求の範囲

1. 共焦点走査光学顕微鏡であって、

-光学走査システムと、

-走査システムを通して、テスト中の標本が照射のエレメントの2つ以上の列個のかつ分離した領域で走査されるよう、任意に異なるスペクトル成分のおよび異なる配向の2つ以上の入力ビームを同時に発生するための手段と、

-走査手段によるデスキャンの後、2つ以上の出力ビームをそれぞれ受けけるための2つ以上の検出器とを含み、各々の検出器は照射されたエレメントの領域のうちの1つから導き出された出力光に実質的に限定される出力ビームを受ける、顕微鏡。

2. 2つ以上のビームは励起波長は異なるが発光波長は同一である2つ以上の顕微鏡チャネルを規定する、請求項1に記載の顕微鏡。

3. 2つ以上のビームは励起波長は同一だが発光波長は異なる2つ以上の顕微鏡チャネルを規定する、請求項1に記載の顕微鏡。

4. 2つ以上のビームは異なる励起波長と異なる発光波長とを有する2つ以上の顕微鏡チャネルを規定する、請求項1に記載の顕微鏡。

5. 各エレメントの領域からの発光は検出器へと続く静止共焦点開口へ偏光で別々に通過し、各々の領域について少

なくとも1つの開口および検出器が存在する、請求項1ないし4のいずれかに記載の顕微鏡。

6. エレメントの領域はスポットまたはバーの形である、請求項1に記載の顕微鏡。

7. バーはスリットの像によって発生するスリット走査共焦点顕微鏡である、請求項6に記載の顕微鏡。

8. 入力ビームは互いに対して小角度で設定される、請求項1ないし7のいずれかに記載の顕微鏡。

9. 入力ビームは多ラインレーザからの光を分割することによって得られる、請求項1ないし8のいずれかに記載の顕微鏡。

10. ビームスプリッタが出力ビームの分離のために設けられる、請求項1ないし9のいずれかに記載の顕微鏡。

11. 出力ビームを波長ごとに分離することは1つ以上の波長選択性フィルタによって促進される、請求項1ないし9のいずれかに記載の顕微鏡。

12. 別個の入力ビームは多波長ビームをプリズムに通過させることによって得られる、請求項1ないし11のいずれかに記載の顕微鏡。

13. 真なる走査されたエレメントの領域に関する経路長時間の差は電子的に補償される、請求項1ないし12のいずれかに記載の顕微鏡。

明細書

発明の名称 共焦点走査光学顕微鏡

発明の分野

この発明は光学共焦点走査顕微鏡に関する。

発明の背景

米国特許公報第1 181 321号は、特に螢光または反射標本の研究のための共焦点走査光学顕微鏡を示す。この機器は標本上の走査された一スポットに光の焦点を合わせることに依存し、その反射されたスポットはデスキャンの検出器前部の共焦点開口によって観察される。

像が標本からの螢光で形成される場合は、標本上に記された光の波長は螢光を助起させるような方法で選択される。放たれた光は適当なビームスプリッタによって、助起する光から分離され、かつ検出器が螢光によって発せられた光にのみ応答するような方法で選択遮断性フィルタを通して。この設計に基づく機器は商業的に入手可能である。それらは適当なビームスプリッタおよびフィルタによって、放たれた光を異なる波長域のビームに分離する設備 (splitter) を含む。この分割の後、2つの検出器で選別可能な異なる螢光色を発する2つの染料が用いられる。代替的に、容認された光学の実務に従って、適当なビームスプリッタの使用により螢光像と同時に反射像が得られる。

先行技術の機器は満足に作用するが、一走査スポットの使用に依存するすべての共焦点走査顕微鏡は、システムのすべての分光選択性が発せられたまたは反射されたビーム

に迅速に運転して助起することを許容するであろう。しかしながら、2つの染料が同一の発光スペクトルを有する場合、または1つのレシオメトリック染料の発光スペクトルが单一波長でモニタされるべき場合は、アワムラ他のシステムはホワイ (White) (米国特許出願番号第2 181 321号) のものに対して有利な点がない、なぜならどちらのシステムも2つの発光信号を分離できないからである。

発明

この発明に従って、共焦点走査光学顕微鏡が提供され、これは

一光学走査システムと、

一走査システムを通過した後、テスト中の標本が照射のエレメントの2つ以上の別個のかつ分離した領域で走査されるように、任意に異なるスペクトル成分および異なる配向の2つ以上の入力ビームを同時に発生するための手段と、さらには

一走査手段によるデスキャンの後、2つ以上の出力ビームをそれぞれ受けたための2つ以上の検出器を含み、各々の検出器は照射されたエレメントの領域のうちの1つから導出された出力光に実質的に対応される出力ビームを受けれる。

この発明は容認された実務に従って、可能な助起率の像の測定を行なうために、助起波長が異なるが発光波長は同一である2つ以上の顕微鏡チャネルを考慮する。

特表平5-509417 (2)

異なる波長の部分に分離することにあるという欠点を被る。もし2つの染料の螢光発光スペクトル間にかなりの重複があれば、それらは識別することができない。たとえば、バカラオ (Bacillus) 他は、1991年ブレナム・プレス (Blane Press) 出版の「共焦点顕微鏡使用法ハンドブック (The Handbook of Confocal Microscopy)」において、通常使用されている染料フルオレセインおよびロードマインはこの形式のシステムでは効果的に分離できないとコメントしている。許容可能な分離を達成するために、励起の波長を変化させることが必要である。これはある顕微鏡のレーザ光をスペクトル的に異なる特性の他の顕微鏡に変化させることにより得られる。まずある顕微鏡の励起でシステムを動作することにより像が得られ、それから異なる顕微鏡の励起ビームで第2の像が得られる。この動作は速度が遅く面倒である。

アワムラ、オデおよびヨネザワ (Yonezawa, Odai & Arai) は、赤、緑および青レーザビームが標本上で独立的に走査され、かつ反射されたビームはダイクロイックフィルタによって分離され、かつその名は3つの分離した直線 CCD 検出器アレイの1つの上で走査動作を実行する顕微鏡を記述した。この記述は SPIE 国際光学技術学会 (1991) の予稿集 165 号 33-10 頁に発表された。原則として、アワムラ他のシステムは螢光顕微鏡として使用される。それからこれらは1種類以上の染料が各ライセンスの間

この発明はまた容認された実務に従って、可能な発光率の像の測定を行なうために、助起波長は同一だが発光波長は異なる2つ以上の顕微鏡チャネルを考慮する。

この発明はこうして多くの種類の走査光学顕微鏡に応用可能である。これは、走査システムの各扫描の間に2つ以上のスペクトル的に別個の助起スポットまたはバーが標本上で共に走査されることが可能な手段を提供する。各スポットからの発光は、検出器へと続く静止共焦点開口へ懸垂に別々に通過し、各スポットについて少なくとも1つの開口および検出器が存在する。

標本の螢光または反射のために各スポットから発せられたビームは、確立された芙蓉に従って検出器の間でスペクトル的にろ過されるかしくは細分化されてもよく、または検出器へ非選択性に通過させててもよい。したがって一走査サイクルで、各々の像が助起および発光周波数の双方において他の像と異なり得る2つ以上の完全な像を得ることが可能である。

この発明は「多変化光学システム」と考えられてもよい、なぜならそれは同一の走査システムおよび対物レンズを通して独立して走査するが平行に近いビーム経路の2つ以上の組を含むからであり、光学経路は共に折り畳まれているという言葉どおりに多変化されている。

実施例の説明

この発明のさらなる特徴および利点が添付の図面を参照

して以下の実施例の説明から明らかとなるであろう。その図面は

図1はこの発明の多重化光学システムを組み入れた共焦点走査顕微鏡の概略図であり、

図2は図1の上部についての代替的かつ好ましい光学的配置を示す概略図であり、さらに

図3は異なるスペクトル特性を有するいくつかのビームがそれによって一つの（たとえば多ライン）レーザーから得られる、この発明での使用のための光学手段を示す概略図である。

図面を参照して、この発明は、拡張された発光ビーム経路を有するレーザー共焦点走査顕微鏡において多数の独立した光学チャンネルが動作のために同時に使用されることを許容する光学アセンブリを提供するが、この種類の顕微鏡への応用に限定はされない。この発明は光のバーまたはスリットが標本上で走査される共焦点顕微鏡、および一つのスポットが走査される共焦点顕微鏡に用いられることが可能である。

図1において、図面を単純にするために2つの独立した光経路のみが示されるが、実際ではその数についての制限はない。

2つのレーザーL1およびL2からの異なるスペクトル特性を有する光は、ビームスプリッタBS1上に向けられる。2つのビームは互いにに対してわずかに角度があり、その角

度は正確さのために図中では誇張される。2つのビームは示されるように走査システム中に反射され、それは両方のビームの角分離を同時に生じる。ビームの角分離は走査全体を通じて維持され、典型的には接眼レンズEおよび対物レンズOの適当な顕微鏡光学系を通して後、標本上で2つの別個の移動する光のスポットS1およびS2の形成を結果として生じる。

反射または散乱のためにS1で標本から光が発せられ、この発せられた光の一部は光学システムを通して戻り、デスキャン、つまり走査システムによって静止ビームへ再変換され、ビームスプリッタBS1を通過し、かつ検出器D1へと続く共焦点開口A1上に落ちる。S2からの光は処理しているが別個の経路に沿って光学システムを通して、検出器D2上に落ちる。好ましい角分離は光学チャネルの満足のいく分離と両立して可能な限り小さい。イメージリジストレーションを許容するために、S1とS2とに対応するスポットによって標本中の所与のポイントを走査する間の時間の差違は、適当な慣用的電子手段、たとえばイメージ処理ソフトウェアによって補償される。2つ以上のスポットが同一の走査線上にあるべきであるということはこのシステムの機能にとって本質的ではない。

図2の好ましい実施例において、走査装置および顕微鏡は図中で示されないが、図1のものと同一であると考えられるべきである。レーザーL1およびL2からのビームは小

さな角度で再びビームスプリッタBS1上へ通過する。ビームスプリッタBS1を通過した後に戻ってくるビームは、第2のビームスプリッタBS2へと通過し、それは二色性特性を有し、その結果一方のビームB1の光の大半は共焦点開口A1へと、それから検出器D1へと通過し、一方他のビームB2はA2およびD2へと選択的に反射される。この修正は、発光周波数の選択を通過するために第2のビームスプリッタBS2の使用を許容するので好まれ、かつまた既存の機器をわざわざ修正するだけで実現され得る。発せられたビームを波長ごとに分離することは、波長選択性フィルタF1およびF2を加えることにより改変され得る。

各々が適切な開口A1またはA2上へと向かう発光ビームの準拠は、BS2と検出器D1またはD2との間に置かれた鏡（図示せず）の使用によって便利に達成され得る。

付加的鏡および二色性反射鏡は、入力ビームL1とL2との間に適切な角度を設ける便利な手段を与える。たとえば、図3はそれにより1つの多ラインレーザーからの光が異なるスペクトル成分および角度を有するビームに分離され得る、多くの可能な手段のうちの1つを示す。

この場合、ガラスまたは他の透明材料の側面が平行のブロックBが使用されて、波長に従ってビームの小さな機方向の分離を生じる。ビーム間の角度はそれからビームをプリズムPを通過させることによって調節され、そこでビー

ムはプリズムの分散力のために異なる角偏差を受ける。プリズムの適切な傾向によって、各々一層波数に対応する平行ビームが発生し、それらはビームスプリッタBS1に向かって収束する。収束の角度はプリズムの角度とその屈折率および分散力によって決定される。図中で実線Sはより長い波長のビームを示し、それはより長い波長の光に対応する点線Dで示されるビームよりもより強く屈折する。

これまで定義されたこの発明の範囲内では、上に説明されたように複数のビームを示すことができる。

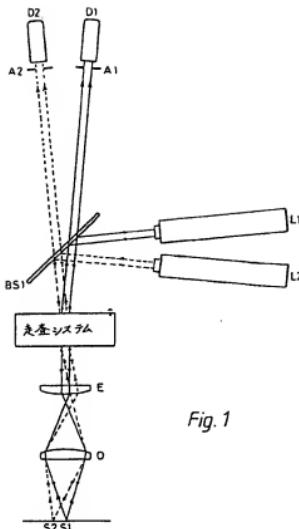


Fig. 1

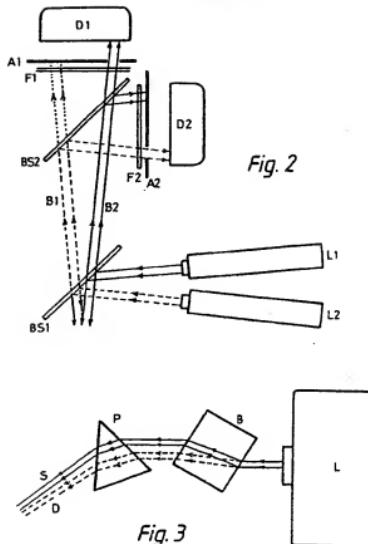


Fig. 2

四九

テスト中の標本が照射の別側のスポットまたはスリット(S1, S2)で同時に走査され、かつ反射または螢光のために標本から発せられた2つの出力ビームがデスクキャンピングされて別々の静止共焦点顕微鏡(A1, A2)および検出器(D1, D2)へと通過する、共焦点走査光学顕微鏡である。

| Category | Category of Disclosure, with reference, from application of the classification process | Number of Copy No. |
|----------|---|--------------------|
| A | Cytometry, volume 2, no. 4, 1982 (US) J.A. Steinonen et al.; "Three-color fluorescence measurements on single cells excited at three wavelengths" (pp. 221-222, text figures 1-3; page 227 - page 228, column 2, line 16) | 1,8,9-7 10,11 |
| A | US-A-4384837 (I. SAMMURA) 18 August 1981; see the whole document ----- | 1,10,11 |

This search has been purely automatic, resulting in the identification of the above-mentioned documents. The automatic Patent Office is in no way liable for errors which may thereby occur for the purpose of information.

三 關 係 告 告

GB 8101176
SA 49662

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family number(s) | Publication date |
|--|------------------|---|--|
| US-A- 3916612 | 11-11-75 | AU-A- 6964274 DE-A- 814663 EP-A- 130077 DE-A- 2422016 | 04-11-75 02-09-74 02-11-77 28-11-76 |
| | | FR-A- 2229621 GB-A- 8101176 JP-A- 50014597 | 08-11-74 02-11-75 23-02-75 |
| GB-A- 2184321 | 17-06-87 | None | |
| DE-A- 3831880 | 03-05-89 | None | |
| US-A- 4930008 | 09-01-90 | JP-A- 63300413 | 14-12-88 |
| US-A- 4294897 | 18-08-81 | JP-C- 1154952 JP-C- 1537000 JP-B- 57019848 DE-A, C 2819841 | 15-07-83 15-07-83 25-10-82 09-11-78 |

For more details about this search, see Official Journal of the European Patent Office, No. 11/83